Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Review Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2023; Vol. 47; No. 1

Laboratory Diagnosis Methods of Malaria Infection

Sepideh Siasi[#], Hediye Vand-Rajabpour[#], Akram Abouie Mehrizi[*]

Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran.

Received: November 01, 2022; Accepted: January 16, 2023

Abstract

Background and Aim: To manage and control malaria- one of the most important infectious diseases in tropical and subtropical regions- a quick and accurate malaria diagnosis method is necessary as a high priority. For this purpose, several methods have been developed. Currently, examining the peripheral blood slide with an optical microscope as a gold standard method, and rapid diagnosis method are used in malaria endemic areas. This article reviews the existing methods and the possible future options to improve the diagnosis of malaria.

Methods: To prepare the present review article, English language articles with no limitation in publication date were reviewed by searching keywords including malaria diagnosis, microscopic and molecular methods, RDT, Nested- PCR, and LAMP in PubMed and Google Scholar databases. Among the collected articles, the most relevant research articles were selected and reviewed.

Conclusion: Despite its limitations, direct observation of peripheral blood smears with a light microscope is still considered the gold standard method for malaria diagnosis. Another malaria diagnosis method is the rapid diagnostic test (RDT), which is a quick and cheap alternative for malaria diagnosis in endemic areas. Regarding malaria elimination programs, the diagnosis of Plasmodium in individuals without symptoms of malaria is challenging as they are generally not detected by routine methods such as peripheral blood smear and rapid diagnostic tests. For this reason, molecular methods are suitable for use in the endemic areas under elimination. Novel techniques that are beneficial in malaria research can replace the usual diagnostic methods in the future.

Keywords: Malaria Diagnosis; Microscopy; Molecular- based methods; RDT; Nested- PCR; LAMP

Please cite this article as: Siasi S, Vand-Rajabpour H, Abouie Mehrizi A. Laboratory Diagnosis Methods of Malaria Infection. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(1):124-137.

[*]**Corresponding Author:** Akram Abouie Mehrizi; Email: abouei@pasteur.ac.ir

[#]Sepideh Siasi and Hediye Vand-Rajabpour contributed equally to this work.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

پژوهش در پزشکی
مقاله مروری
فصلنامه علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۷، شماره ۱، سال ۱۴۰۲ شمسی، صفحات ۱۲۴ تا ۱۳۷

روش‌های تشخیص آزمایشگاهی عفونت مالاریا

سپیده سیاسی[#]، هدیه وندرجب‌پور[#]، اکرم ابوئی مهریزی[*]

بخش تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۶

خلاصه

سابقه و هدف: برای مدیریت و کنترل بیماری مالاریا - یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری - تشخیص سریع و دقیق این بیماری ضروری و از اولویت بالایی برخوردار است. به این منظور روش‌های متعددی برای تشخیص مالاریا توسعه یافته است و در حال حاضر از روش تشخیص بررسی لام خون محیطی با میکروسکوپ نوری به عنوان روش استاندارد طلایی و روش‌های تشخیص سریع در مناطق آندمیک مالاریا استفاده می‌شود. هدف این مقاله بررسی روش‌های موجود و روش‌های در حال توسعه به عنوان گزینه‌های احتمالی آینده برای بهبود تشخیص مالاریاست.

روش کار: برای نگارش این مقاله مروری با جست‌وجو کلید واژگان از جمله تشخیص مالاریا، روش میکروسکوپی، روش‌های مولکولی، RDT، Nested- PCR و LAMP در پایگاه داده‌های PubMed و Google Scholar، مقالات انگلیسی زبان بدون محدودیت تاریخ بررسی شد. مقاله‌هایی که بیشترین ارتباط را با اهداف نگارش این مقاله داشتند، انتخاب و مطالعه شدند.

یافته‌ها و نتیجه‌گیری: بررسی لام‌خون محیطی با میکروسکوپ نوری، با وجود محدودیت‌هایی که دارد، همچنان روش استاندارد طلایی برای تشخیص مالاریا محسوب می‌شود. از دیگر روش‌های تشخیصی مالاریا می‌توان به آزمایش‌های تشخیصی سریع اشاره کرد که با توجه به ویژگی‌های آن، جایگزینی سریع و ارزان برای تشخیص مالاریا در مناطق آندمیک و دورافتاده است. یکی از موانع برنامه حذف مالاریا، تشخیص عفونت در بیماران بدون علامت و یا با آلودگی کم است؛ زیرا عموماً با روش‌های روتین مانند بررسی لام خون محیطی و آزمایش‌های تشخیصی سریع، شناسایی نمی‌شوند. از این جهت روش‌های مولکولی در مناطق آندمیک مالاریا با برنامه حذف، مناسب بهره‌گیری هستند. روش‌های نوین که در تحقیقات مالاریا بسیار کاربردی هستند؛ می‌توانند در آینده جایگزین روش‌های معمول شوند.

واژگان کلیدی: تشخیص مالاریا؛ روش میکروسکوپی؛ روش‌های مولکولی؛ RDT؛ Nested- PCR؛ LAMP

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Siasi S, Vand-Rajabpour H, Abouie Mehrizi A. Laboratory Diagnosis Methods of Malaria Infection. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(1):124-137.

[*]**نویسنده مسئول مکاتبات:** اکرم ابوئی مهریزی؛ آدرس پست الکترونیکی: abouei@pasteur.ac.ir

[#]این افراد به یک میزان در نگارش مقاله مشارکت داشته‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

مقدمه

مالاریا یک بیماری انگلی است که به وسیله تک‌یاخته‌ای از جنس پلاسمودیوم ایجاد می‌شود. پلاسمودیوم با گزش پشه آنوفل ماده آلوده به انسان منتقل می‌شود (۱). پلاسمودیوم گونه‌های مختلف دارد؛ با این حال تنها شش گونه از آنها انسان را مبتلا می‌کنند: *پلاسمودیوم فالسیپارم*، *پلاسمودیوم ویواکس*، *پلاسمودیوم اواله*، *پلاسمودیوم مالاریه*، *پلاسمودیوم نولزی* و *پلاسمودیوم سینومولژی*. از این میان، دو گونه *پلاسمودیوم نولزی* و *پلاسمودیوم سینومولژی* بین انسان و حیوان مشترک بوده و نسبت به سایر گونه‌ها کمتر در انسان دیده می‌شوند (۴-۲). بیشتر بار جهانی مالاریا در کشورهای با سرایت متوسط تا زیاد در جنوب صحرای آفریقا گزارش شده است. به علاوه، این بیماری به صورت آندمیک در آسیا و آمریکای لاتین نیز وجود دارد. در سال‌های اخیر، قبل از همه‌گیری کرونا، سالانه بین ۲۲۰-۲۰۰ میلیون نفر به مالاریا مبتلا می‌شدند که منجر به مرگ ۵۵۰-۴۰۰ نفر در سال می‌شد. در سال ۲۰۲۰، یک سال بعد از همه‌گیری کرونا و اختلال در خدمات‌رسانی، آمار مبتلایان به بیش از ۲۴۰ میلیون نفر و مرگ‌ومیر ناشی از مالاریا به بیش از ۶۲۰ هزار نفر افزایش یافت (گزارش ۲۰۲۱ سازمان بهداشت جهانی). در ایران، بیش از چهار پنجم موارد ابتلا از استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان گزارش شده است. با توجه به برنامه‌های جمهوری اسلامی ایران در راستای مدیریت و حذف مالاریا، آمار مبتلایان ایران از سال ۲۰۱۰ روند کاهشی داشته و در سال ۲۰۲۰ برای سومین سال متوالی هیچ مورد بومی گزارش نشده است (۵). با این حال، موارد وارده روند افزایشی داشته است، بنابراین دیده‌بانی بیماری باید با دقت انجام شود. از بین گونه‌های نامبرده، گونه‌های *پلاسمودیوم فالسیپارم*، *پلاسمودیوم ویواکس* و *پلاسمودیوم مالاریه* در ایران شناسایی شده که بیشترین موارد ابتلا، به *پلاسمودیوم ویواکس* و سپس به *پلاسمودیوم فالسیپاروم* اختصاص داشته است (۶).

برای ریشه‌کنی و حذف مالاریا از استراتژی‌هایی مانند توسعه داروهای جدید و واکسن مناسب می‌توان بهره برد. درحال حاضر، تنها واکسن مالاریا RTS است، اما با توجه به کارایی کم این واکسن، امکان استفاده به صورت گسترده وجود نداشته و فقط در برخی کشورهای آفریقایی استفاده می‌شود (۵). توسعه واکسن مالاریایی مؤثر همواره با چالش‌هایی روبه‌رو بوده است که از مهم‌ترین این چالش‌ها وجود تنوع ژنتیکی در ژن‌های کاندید واکسن مختلف نظیر CSP[1]، MSP[2] و CelTOS[3] است (۱۲-۷). بنابراین با توجه به اهمیت بیماری مالاریا، همواره تشخیص صحیح و به موقع برای درمان مؤثر، به منظور کنترل و حذف مالاریا اجتناب ناپذیر است؛ زیرا تشخیص مؤثر، سبب کاهش عوارض و مرگ و میر ناشی از مالاریا می‌شود. تمایز مالاریا از سایر عفونت‌ها با توجه به علایم بالینی مشابه، دشوار است. بنابراین، لازم است تشخیص‌های تاییدی با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی مانند بررسی لام خون محیطی، آزمایش‌های تشخیص سریع مالاریا، روش‌های مولکولی و نوین صورت گیرد که اساس همه آنها بر پایه تشخیص انگل در خون بیمار (مرحله خونی) است. تشخیص گونه‌های مختلف عامل مالاریا به منظور استفاده از داروی صحیح و درمان مؤثر بسیار حائز اهمیت است. این مقاله روش‌های مختلف تشخیص گونه‌های پلاسمودیوم عامل مالاریای انسانی را بررسی کرده و نقاط قوت و ضعف آنها را ارزیابی می‌کند.

روش کار

این مطالعه به صورت مروری جامع انجام شد (کد اخلاق: IR.PII.REC.1399.071). با جست‌وجو کلید واژگان از جمله تشخیص مالاریا، روش میکروسکوپی، روش‌های مولکولی، RDT[4]، Nested- PCR[5] و LAMP[6] در پایگاه داده‌های

[1] Circumsporozoite Protein
[2] Merozoite Surface Protein
[3] Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites
[4] Rapid Diagnostic Tests
[5] Nested Polymerase Chain Reaction
[6] Loop-mediated isothermal DNA amplification

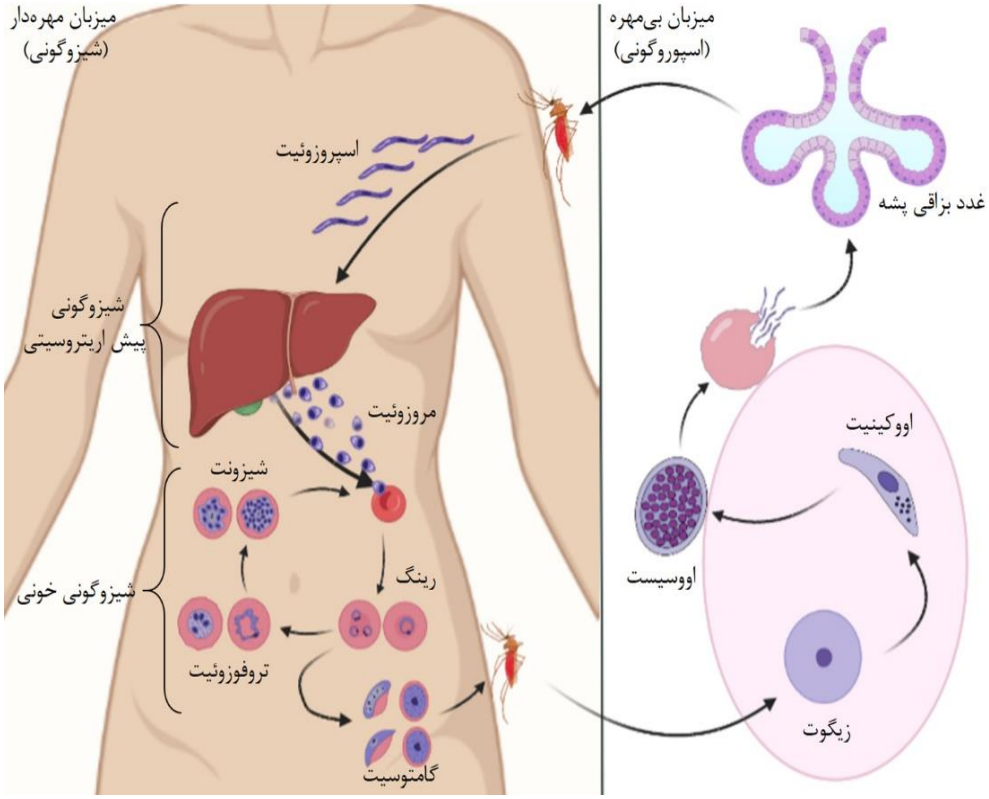
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

PubMed و Google Scholar مقالات انگلیسی زبان بدون محدودیت تاریخ جمع‌آوری شدند. مقاله‌هایی که دارای بیشترین پیوند با اصل موضوع بودند، مورد بررسی دقیق قرار گرفتند و از اطلاعات آنها برای نگارش این مقاله بهره برده شد. از میان مقاله‌های بسیاری که مورد مطالعه قرار گرفت، با توجه به محتوا، اعتبار و کیفیت مقاله در پایان ۵۰ مقاله انتخاب شد.

یافته‌ها و بحث

بررسی لام خون محیطی با میکروسکوپ نوری:

با توجه به چرخه زندگی انگل پلاسمودیوم در دو میزبان مهره‌دار و بی‌مهره (شکل ۱)، تشخیص انگل در بدن انسان تنها در مرحله خونی از چرخه زندگی امکان‌پذیر است. در این مرحله، مروزوئیت‌ها در اثر پاره شدن سلول‌های کبدی آلوده به جریان خون وارد شده و به گلبول‌های قرمز حمله می‌کنند و مرحله تولید مثل غیرجنسی را آغاز می‌کنند که مرحله علامت‌دار بیماری است. مروزوئیت‌های آزاد شده از گلبول‌های قرمز می‌توانند به سایر گلبول‌های قرمز خون حمله کنند و به تکثیر خود ادامه دهند. گاهی مروزوئیت‌های آزاد شده به گامتوسیت‌های نر یا ماده تمایز می‌یابند که گامتوسیت‌ها نیز در لام خون محیطی قابل مشاهده بوده و یکی از ملاک‌های تشخیصی هستند. گامتوسیت‌ها از طریق خونخواری به بدن پشه منتقل می‌شوند و پس از کامل شدن سیکل زندگی، پشه می‌تواند فرد دیگری را با گونه‌های پلاسمودیوم آلوده کند (۱).



شکل ۱- چرخه زندگی انگل پلاسمودیوم.

سمت راست مربوط به چرخه جنسی انگل پلاسمودیوم در بدن پشه آنوفل و سمت چپ مربوط به چرخه غیرجنسی انگل پلاسمودیوم در بدن انسان است. پلاسمودیوم در بدن انسان، ابتدا شیزوگونی بافتی و سپس شیزوگونی خونی را طی می‌کند. تعدادی از انگل‌ها نیز پس از ورود به گلبول قرمز تبدیل به گامتوسیت می‌شوند. هنگام خونخواری پشه ماده آنوفل از فرد آلوده، گامتوسیت‌های نر و ماده نیز وارد معده پشه می‌شوند و در آنجا سیکل جنسی پشه ادامه یافته و در نهایت هزاران اسپروزوئیت تولید و به غده بزاقی پشه می‌رسد که می‌تواند در خونخواری بعدی آنها را به فرد جدیدی انتقال داده و آن فرد را آلوده کند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

عامل بیماری مالاریا (پلاسمودیوم) معمولاً با بررسی میکروسکوپی لام خون محیطی رنگ‌شده با رنگ‌های گیمسا، رایت و فیلد تشخیص داده می‌شود (۱۳). این روش از زمان کشف اولیه انگل پلاسمودیوم توسط لاوران و بهبود تکنیک‌های رنگ‌آمیزی توسط رومانوفسکی در اواخر دهه ۱۸۰۰، اندکی تغییر کرده است. در سال ۱۹۰۲، رنگ گیمسا توسط گوستاو گیمسا از ترکیب ائوزین، متیلن بلو و azure B ساخته شد (۱۴). با وجود گذشت بیش از یک قرن، تشخیص میکروسکوپی و شناسایی گونه‌های پلاسمودیوم در گسترش خون غلیظ رنگ‌آمیزی شده با گیمسا (برای غربالگری انگل پلاسمودیوم) و گسترش خونی نازک (برای تأیید گونه‌ها) روش استاندارد طلایی برای تشخیص آزمایشگاهی است (۱۵). در این روش، گسترش غلیظ بدون تثبیت و گسترش نازک پس از تثبیت با متانول ۱۰۰درصد، با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی می‌شوند. به منظور تشخیص صحیح، حداقل ۱۰۰ فیلد از گسترش ضخیم باید بررسی شود، درصورت مشاهده انگل در لام رنگ شده، ۱۰۰ فیلد دیگر برای تشخیص موارد احتمالی آلودگی با دو گونه بررسی می‌شود. با تعیین میزان آلودگی از طریق بررسی گسترش ضخیم، پزشکان به شدت بیماری و نحوه پاسخ به درمان پی می‌برند. برای شمارش انگل‌های پلاسمودیوم در گسترش ضخیم تعداد انگل‌ها به ازای مشاهده ۲۰۰ گلبول سفید شمارش می‌شود؛ اگر تعداد انگل بیش از ۱۰ باشد از فرمول زیر برای محاسبه تعداد انگل در هر میکرولیتر خون استفاده می‌شود.

فرمول (۱):

$$\frac{۸۰۰۰}{۲۰۰} \times \text{تعداد انگل شمارش شده} = \text{میزان انگل در هر میکرولیتر خون}$$

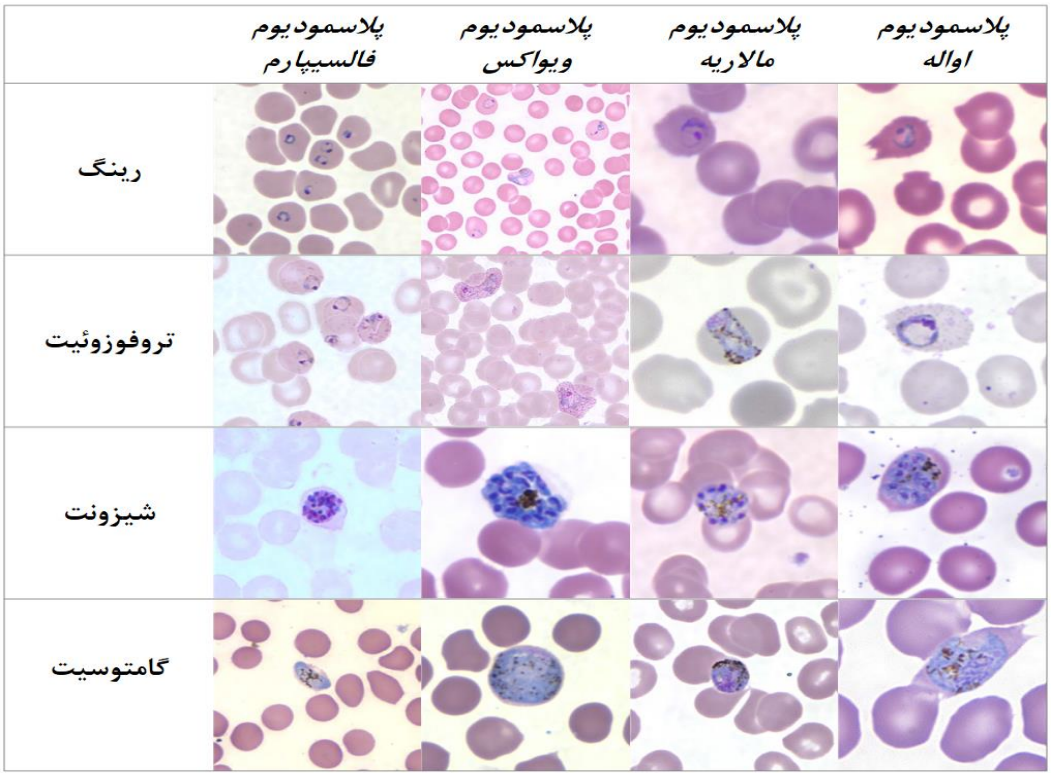
درصورتی که تعداد انگل کمتر از ۹ باشد تعداد انگل‌ها به ازای مشاهده ۵۰۰ گلبول سفید شمارش می‌شود و از فرمول زیر برای محاسبه تعداد انگل در هر میکرولیتر خون استفاده می‌شود (۱۶).

فرمول (۲):

$$\frac{۸۰۰۰}{۵۰۰} \times \text{تعداد انگل شمارش شده} = \text{میزان انگل در هر میکرولیتر خون}$$

به منظور تشخیص چهارگونه *پلاسمودیوم فالسیپارم*، *پلاسمودیوم ویواکس*، *پلاسمودیوم اواله* و *پلاسمودیوم مالاریه* به روش میکروسکوپی، از ویژگی‌های مورفولوژی خاص هر گونه در مرحله سیکل خونی انگل استفاده می‌شود. پس از رنگ‌آمیزی لام فرد مشکوک به مالاریا، برای تشخیص گونه‌های مختلف پلاسمودیوم معیارهای ذیل در نظر گرفته می‌شود. چنانچه فرد مبتلا به *پلاسمودیوم فالسیپاروم* باشد، در لام تهیه شده از خون فرد گامتوسیت‌های هلالی شکل دیده می‌شود. همچنین یک یا دو عدد فرم رینگ در گلبول‌های قرمز آلوده دیده می‌شود که ممکن است دو هسته‌ای نیز باشند و میزان انگل مشاهده شده در لام رنگ شده افراد مبتلا به گونه *پلاسمودیوم فالسیپارم* زیاد است (شکل ۲). از معیارهای مهم تشخیص گونه *پلاسمودیوم ویواکس*، حضور گلبول‌های قرمز آلوده به پلاسمودیوم ویواکس بزرگتر از حد معمول است. تروفوزوئیت‌های *پلاسمودیوم ویواکس* آمیبوئیدی شکل بوده و شیزونت‌های بالغ بین ۲۴-۱۲ مروزوئیت دارند. گامتوسیت‌های این گونه گرد تا بیضی شکل و فشرده هستند و تقریباً گلبول قرمز را پر می‌کنند (شکل ۲). برای تشخیص *پلاسمودیوم مالاریه* در افراد مبتلا معیارهایی همچون تروفوزوئیت‌های مستطیلی شکل و شیزونت‌های به شکل گل مینا (Rosettes form) با ۱۲-۶ مروزوئیت کمک‌کننده هستند (شکل ۲). از معیارهای تشخیص گونه *پلاسمودیوم اواله*، مشاهده گلبول‌های قرمز آلوده گرد تا تخم مرغی شکل و مقداری زائده دار در لام افراد مبتلا است. همچنین شیزونت‌های بالغ در این گونه، بین ۱۴-۶ مروزوئیت دارند (شکل ۲) (۱۷).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]



شکل ۲- نمای میکروسکوپی فرم‌های رینگ، تروفوزوئیت، شیزونت و گامتوسیت در چهار گونه مهم عامل مالاریای انسانی: *پلاسمودیوم فالسیپارم*، *پلاسمودیوم ویواکس*، *پلاسمودیوم اواله* و *پلاسمودیوم مالاریه* (۱۷).

Image courtesy of DPDx, Centers for Disease Control and Prevention (https://www.cdc.gov/dpdx)

نقاط قوت و ضعف روش میکروسکوپی:

اگرچه روش میکروسکوپی به عنوان روش استاندارد طلایی، ارزان و قابل اعتماد است اما به متخصصان و آموزش کادر درمان نیاز دارد (۱۸). زمانی که میزان آلودگی به انگل کم باشد، ممکن است نتیجه بررسی، منفی تلقی شود؛ همچنین مشکل در تشخیص عفونت بیماران بدون علامت (به دلیل پارازیتمی کم) و یا بیمارانی که به دو گونه انگل آلوده هستند، از دیگر معایب این روش است. چراکه ممکن است در عفونت توأم، با شناسایی گونه غالب، گونه دوم تشخیص داده نشود (۱۹، ۲۰) (جدول ۲). از آنجایی که منفی کاذب در گسترش نازک محتمل است؛ بنابراین برای دستیابی به نتیجه قابل اعتماد باید آزمایش را تکرار و تعداد فیلدهای بیشتری (تا ۲۰۰ فیلد) را در گسترش نازک بررسی کرد (۲۱). مثبت کاذب نیز در آزمایشگاه‌هایی با مراجعان بالا و زمانی که تعداد پرسنل آزمایشگاه متناسب با حجم کار آزمایشگاه نباشد، رایج است. زیرا این امر سبب می‌شود که پرسنل آزمایشگاه زمان و دقت کافی صرف بررسی لام خون محیطی نکنند. تشخیص منفی کاذب سبب می‌شود که زمان طلایی برای درمان بیمار از دست برود. تشخیص مثبت کاذب نیز منجر به مواجه شدن بیمار با داروی مالاریا و عوارض جانبی آن شده و درمان به موقع سایر عفونت‌ها به تعویق می‌افتد که می‌تواند خطرناک باشد (۲۲).

آزمایش‌های تشخیص سریع مالاریا (RDTs):

آزمایش‌های تشخیص سریع مالاریا (RDTs[7]) در اوایل دهه ۱۹۹۰ توسعه پیدا کردند (۲۳). کیت‌های RDT مالاریا معمولاً دو آنزیم لاکتات دهیدروژناز پلاسمودیومی (pLDH[8]) و آلدولاز که در مسیرهای گلیکولیتیک پلاسمودیوم تولید می‌شوند و نیز

[7] Rapid Diagnostic Tests
[8] Plasmodium lactate dehydrogenase

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

پروتئین غنی از هیستیدین *پلاسمودیوم فالسیپارم* (PfHRP[9]) را تشخیص می‌دهند (۲۴). تروفوزوئیت‌های پلاسمودیوم، پروتئین‌های غنی از هیستیدین را به درون پلاسمای انسان آزاد می‌کنند (۲۵) که این موضوع اساس آزمایش‌های تشخیصی سریع مالاریا است. در این آزمایش دو نوع آنتی‌بادی ضد HRP استفاده می‌شود؛ یکی از آنها متصل به طلای کلوئیدی و دیگری که به عنوان کنترل روی نوار آزمایش متصل شده است. با اضافه کردن نمونه خون به کیت، گلبول‌های قرمز پاره شده و پروتئین‌های غنی از هیستیدین به آنتی‌بادی متصل به طلای کلوئیدی اتصال می‌یابند. پس از اضافه کردن بافر مخصوص (running buffer)، خون و آنتی‌بادی متصل به طلای کلوئیدی در طول نوار حرکت کرده تا از خط کنترل عبور کنند. در صورت وجود پلاسمودیوم در پلاسمای فرد، ترکیب HRP و آنتی‌بادی روی نوار آزمایش به صورت خط صورتی رنگ مشخص می‌شود (۲۳).

نقاط قوت و ضعف روش RDT:

انجام RDT نسبتا آسان و سریع است و نتیجه آن در کمتر از ۲۰ دقیقه مشخص می‌شود؛ همچنین RDT به تجهیزات پیشرفته از جمله میکروسکوپ نوری و نیروی متخصص نیاز ندارد (۲۶). این ویژگی‌ها سبب شده RDT روشی مناسب برای بهره‌گیری در مناطق دورافتاده باشد. یکی از نقاط ضعف RDT، ناتوانی آن در تشخیص سویه‌های *پلاسمودیوم فالسیپارم* فاقد پروتئین ۲ و ۳ غنی از هیستیدین است که دربعضی مناطق نسبتاً رایج است (۲۷). البته در غیاب پروتئین PfHRP2، بیشتر آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در این روش، به دلیل همسانی ساختاری، PfHRP3 را شناسایی می‌کنند (۲۸). متأسفانه تعداد انگل‌های *پلاسمودیوم فالسیپارم* فاقد ژن PfHRP3 نسبت به انگل‌های فاقد ژن PfHRP2 بیشتر است (۲۹) که این مهم می‌تواند به تشخیص منفی کاذب منتج شود. حساسیت RDT (sensitivity)ها بسته به شدت بیماری و آنتی ژن هدف، ۷۴درصد تا ۹۵درصد و اختصاصیت (specificity) آنها ۹۶/۹درصد است (۳۰، ۳۱). اگر چه روش میکروسکوپی نیاز به نیروی آموزش‌دیده دارد، ولی حساسیت بیشتری نسبت به RDT دارد. بنابراین برای کاهش موارد منفی کاذب بهتر است از روش میکروسکوپی به صورت مکمل استفاده شود (۳۲).

اخیراً تحقیقاتی در زمینه RDT با حساسیت بالا (uRDT[10]) انجام شده است که این روش، لاکتات دهیدروژناز پلاسمودیومی و پروتئین غنی از هیستیدین پلاسمودیوم را تشخیص می‌دهد با این تفاوت که حساسیت بیشتری نسبت به RDT دارد و پارازیتمی کم را نیز تشخیص می‌دهد (۳۳، ۳۴) به طوری که حساسیت این روش نزدیک به روش میکروسکوپی است (۳۵).

روش تشخیص مولکولی بر پایه Nested Polymerase Chain Reaction

یکی از چالش‌های برنامه حذف مالاریا، تشخیص عفونت در بیماران بدون علامت و یا با آلودگی کم است؛ زیرا عموماً به دلیل پارازیتمی کم با روش‌های روتین مانند بررسی لام خون محیطی و آزمایش‌های تشخیصی سریع، شناسایی نمی‌شوند (۳۶). از این رو روش‌های مولکولی در کشورها و مناطق با برنامه حذف، مناسب بهره‌گیری هستند. برای مثال، در مراحل اجرای برنامه حذف مالاریا در ایران، به منظور ارزیابی میزان عفونت بدون علامت و سپس برنامه‌ریزی مناسب برای دستیابی به حذف، در طی مطالعه‌ای میزان عفونت بدون علامت در ساکنان منطقه آندمیک مالاریا به روش مولکولی بررسی شد و نتایج نشان داد که با توجه به عدم شناسایی موارد بدون علامت، این منطقه می‌تواند کاندیدای مناسبی برای اجرای برنامه حذف مالاریا باشد (۳۷، ۳۸). در دهه گذشته، روش تشخیصی مولکولی واکنش زنجیره‌ای (PCR) محبوبیت بیشتری از روش میکروسکوپی معمولی و RDT کسب کرده است. تکنیک PCR، ویژگی و حساسیت بالایی در تشخیص پلاسمودیوم دارد. PCR، علاوه بر تشخیص گونه‌های مختلف، کاربرد قابل توجه خود را در مطالعات follow up در زمینه مبارزه با مالاریا، اپیدمیولوژی مولکولی و مطالعات مقاومت دارویی ثابت کرده‌است. اگرچه

[9] Plasmodium falciparum histidine rich protein

[10] Ultra- sensitive RDT

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

برتری PCR به روش میکروسکوپی و RDT ثابت شده است، اما راه‌اندازی تشخیص مولکولی در آزمایشگاه‌های مناطق آندمیک مالاریا به دلیل هزینه‌های بالا، زمان‌بر بودن، نیاز به تخصص و نظارت همیشه ممکن نیست (۳۹).

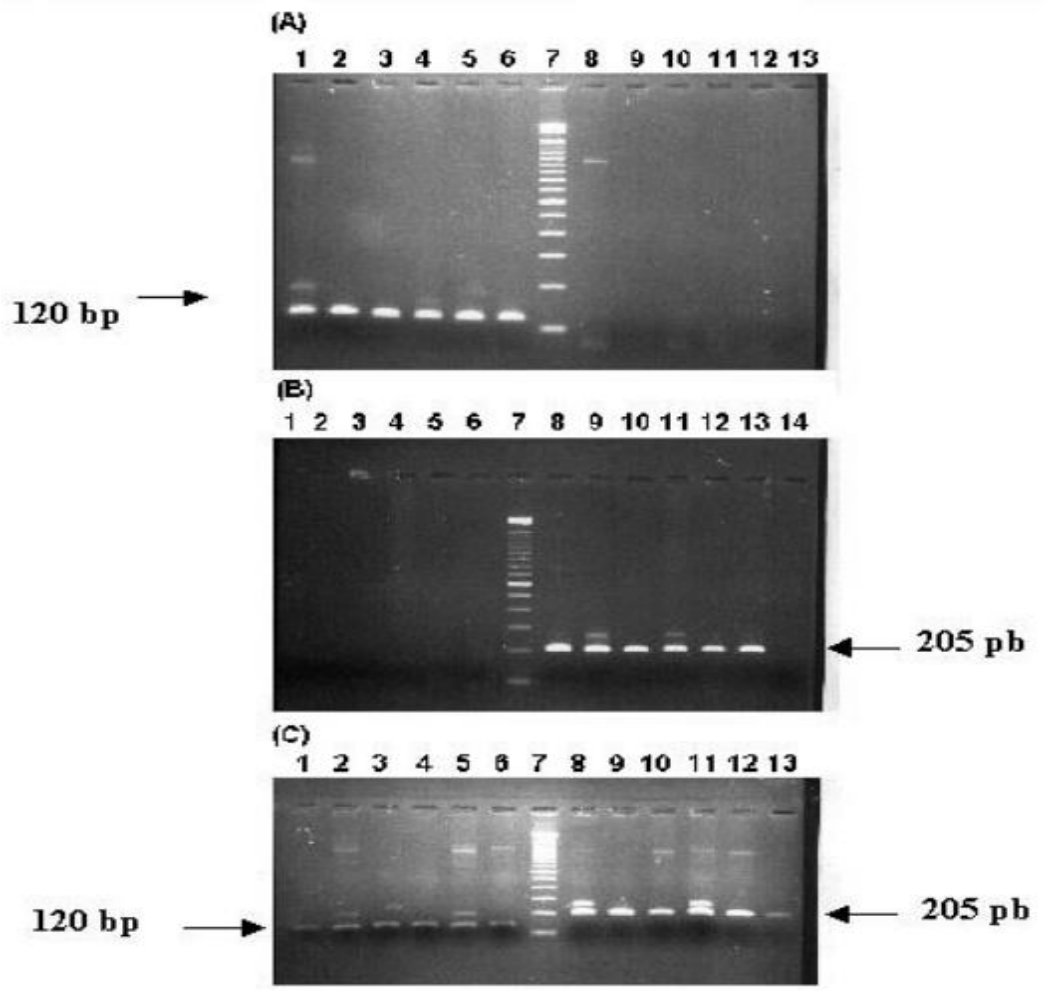
یکی از متداول‌ترین روش‌های تشخیص مولکولی، روش مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است که زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی (18 Single Strand Ribosome RNA (18ssrRNA)) را مورد شناسایی قرار می‌دهد. از مزیت‌های این ژن می‌توان به چند کپی بودن آن اشاره نمود. همچنین از آنجا که این ژن از ژن‌های ضروری و حفظ شده است، دچار حذف نمی‌شود و به آسانی تکثیر شده و تشخیص داده می‌شود (۴۰). واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) مبتنی بر ژن 18ssrRNA، روشی دقیق‌تر و حساس‌تر از روش مشاهده گسترش خون با میکروسکوپ نوری است. برای تفکیک گونه‌های *پلاسمودیوم* نیز از تکنیک Nested- PCR استفاده می‌شود که نسبت به PCR یک مرحله‌ای از درجه حساسیت بالاتری برخوردار است و قادر به تشخیص ۱۰-۱ انگل در هر میکرولیتر خون است. در این روش، در PCR اول (Nest 1)، از پرایمرهای $rPLU_5$ و $rPLU_6$ استفاده می‌شود که ویژه جنس *پلاسمودیوم* بوده و یک قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی از ژن ssrRNA را تکثیر می‌کند (جدول ۱). سپس در مرحله بعد (PCR دوم یا Nest-2) بخشی ازمحصول PCR اول توسط پرایمرهای ویژه گونه (شکل ۳) تکثیر خواهد شد. اندازه محصول PCR در Nest-2 برای هر گونه متفاوت است، بدین ترتیب که پرایمرهای ویژه *P. falciparum* یک قطعه ۲۰۵ جفت بازی و پرایمرهای *P. vivax* یک قطعه ۱۲۰ جفت بازی را تکثیر می‌کنند (شکل ۳). محصول PCR پرایمرهای گونه *P. malariae* قطعات ۱۴۴ جفت بازی خواهد بود و پرایمرهای گونه *P. ovale* یک قطعه ۸۰۰ جفت بازی را تکثیر می‌کند (جدول ۱) (۴۱، ۴۲).

جدول ۱- توالی پرایمرهای ویژه تشخیص گونه‌های پلاسمودیوم عامل مالاریای انسانی. ستون آخر این جدول سایز DNA حاصل از PCR با پرایمر مناسب هر گونه را نشان می‌دهد (۴۱، ۴۲).

جنس یا گونه مورد تشخیص	نام پرایمر	توالی ژنی پرایمرها	سایز محصول PCR
پلاسمودیوم	rPLU5 rPLU6	۵’ CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC ۳’ ۵’TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG۳’	۱۱۰۰
پلاسمودیوم فالسیپاروم	rFAL1 rFAL2	۵’TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT۳’ ۵’ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC۳’	۲۰۵
پلاسمودیوم ویواکس	rVIV1 rVIV2	۵’CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC۳’ ۵’ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA۳’	۱۲۰
پلاسمودیوم اوالِه	rOVA1 rOVA2	۵’ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA۳’ ۵’GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG۳’	۸۰۰
پلاسمودیوم مالاریه	rMAL1 rMAL2	۵’ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC۳’ ۵’AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA۳’	۱۴۴

برای آنالیز نتایج، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲درصد حاوی رنگ DNA safe stain و یا رنگ مناسب دیگری برای رنگ‌آمیزی DNA، الکتروفورز شده و باندها با استفاده از اشعه ماوراء بنفش مشاهده می‌شوند (شکل ۳) (۴۳).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]



شکل ۳- تصویر ژل آگاروز از الکتروفورز محصولات Nested- PCR با استفاده از پرایمرهای مخصوص برای تشخیص گونه‌های پلاسمودیوم.

شکل A نمونه‌های آلوده به *پلاسمودیوم ویواکس* را نشان می‌دهد که با استفاده از پرایمرهای ویژه گونه *پلاسمودیوم ویواکس* تکثیر شده‌اند (چاهک‌های ۶-۱) ولی با پرایمرهای ویژه گونه *پلاسمودیوم فالسیپاروم* تکثیر نشده‌اند (چاهک‌های ۱۳-۸).

شکل B نمونه‌های آلوده به *پلاسمودیوم فالسیپاروم* را نشان می‌دهد که با استفاده از پرایمرهای ویژه گونه *پلاسمودیوم فالسیپاروم* تکثیر شده‌اند (چاهک‌های ۱۳-۸) ولی با پرایمرهای ویژه گونه *پلاسمودیوم ویواکس* تکثیر نشده‌اند (چاهک‌های ۶-۱).

شکل C عفونت همزمان با *پلاسمودیوم ویواکس* (چاهک‌های ۶-۱) و *پلاسمودیوم فالسیپاروم* (چاهک‌های ۱۳-۸) را در نمونه‌ها نشان می‌دهد. چاهک شماره ۷ در هر سه شکل حاوی اندازه وزن مولکولی bp ۱۰۰ است (۴۴).

Doni و همکاران در سال ۲۰۱۶، نمونه‌های خون خشک شده روی کاغذ صافی را بطور همزمان با روش میکروسکوپی و Nested PCR بررسی کردند و نتایج نشان داد که حساسیت و اختصاصی بودن Nested- PCR به ترتیب ۱۰۰ و ۹۷/۲٪ می‌باشد و براساس نتایج حاصل، اعلام نمود که Nested- PCR حساس‌تر و دقیق‌تر از میکروسکوپی است. این مطالعه همچنین تاکید می‌کند که Nested PCR روشی عالی برای دستیابی به داده‌های اپیدمیولوژیک دقیق در همه‌گیری مالاریا است. از این رو تشخیص پلاسمودیوم توسط Nested- PCR می‌تواند تشخیص‌های مثبت کاذب، تشخیص نادرست، درمان نادرست و در نتیجه ظهور و گسترش مقاومت دارویی را کاهش دهد (۴۵).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

از PCR می‌توان برای تایید ابتلا و یا عدم ابتلا مسافرانی که از مناطق آندمیک بازگشته‌اند و افراد مهاجری که مشکوک به مالاریا هستند نیز استفاده کرد. در صورت تشخیص عفونت، علاوه بر اینکه این افراد بلافاصله درمان می‌شوند، از ایجاد کانون‌های جدید بیماری نیز ممانعت بعمل می‌آید. تست PCR بطور روتین در آزمایشگاه‌های مرجع مناطق بومی مالاریا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۶).

نقاط قوت و ضعف روش مولکولی بر پایه Nested - PCR:

از ویژگی‌های خوب روش Nested - PCR می‌توان به تشخیص و شناسایی انگل‌های مالاریا با تعداد انگل کم در میلی‌متر خون (پارازیتمی کم) و نیز تشخیص عفونت همزمان به چندین گونه انگل مالاریا اشاره کرد. در ضمن این روش می‌تواند موارد ابتلای بدون علامت مالاریا را به درستی تشخیص دهد. با این حال، استفاده روتین از این روش در آزمایشگاه‌های معمول به دلیل گران قیمت بودن، روش تکنیکی خاص، زمان‌گیر بودن آن، نیاز به افراد آموزش دیده و همچنین نیاز به تجهیزات پیشرفته، مرسوم نیست (۴۷).

با توجه به مطالب ذکر شده و مزایا و معایب ذکر شده برای روش‌های موجود برای تشخیص مالاریا، (جدول ۲)، پیشنهاد می‌شود روش مناسب با توجه به هدف مورد نظر انتخاب شود. به طور مثال روش RDT برای مناطق دورافتاده‌ای که از تجهیزات کافی برخوردار نیستند می‌تواند مثمرثمر باشد و همچنین برای تایید و تشخیص اولیه ابتلا به انگل، مشاهده گسترش خون مناسب است. در حالی‌که روش مولکولی PCR برای اهداف مطالعات اپیدمیولوژیک و برنامه کشوری حذف مالاریا سازگار است. امید است با پیشرفت روز افزون علم و تلاش‌های مستمر محققین، روش‌هایی با دقت و صحت بالاتر و مقرون به صرفه که طی مدت زمان کوتاه‌تری منتج به نتیجه شود، ایجاد شود که بتوانند معایب و نواقص روش‌های موجود را بهبود بخشند.

جدول ۲- مقایسه روش‌های RDT، میکروسکوپی و PCR.

نوع تست	مزایا	معایب
RDT	آسان سریع عدم نیاز به دستگاه های پیشرفته عدم نیاز به پرسنل آموزش دیده و ماهر	منفی کاذب دقت پایین
میکروسکوپی	ارزان سریع	نیاز به پرسنل آموزش دیده منفی کاذب به هنگام آلودگی کم و در بیماران بدون علامت مثبت کاذب در صورت بی‌دقتی اپراتور و یا عدم آموزش کافی
PCR	شناسایی پارازیتمی کم شناسایی موارد بدون علامت شناسایی ابتلای همزمان به چند گونه انگل	تکنیکی بودن نیازمند دستگاه‌های پیشرفته زمان‌بر بودن هزینه زیاد

روش‌های تشخیصی نوین:

با توجه به اهمیت تشخیص مالاریا، انواع مختلفی از ابزارهای تشخیصی برای تشخیص پلاسمودیوم، از جمله روش میکروسکوپی، RDT و Nested - PCR توسعه و استفاده شده‌اند. با پیشرفت تکنولوژی، روش‌های دیگری از جمله روش‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک (quantitative PCR و isothermal amplification) و فلوسیتومتری نیز توسعه یافته‌اند. Real - Time - PCR، از روش‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک است که از برچسب‌های فلورسنت استفاده می‌کند و قادر به پایش مداوم قسمت تکثیر شده توسط (PCR) در طول واکنش است. این روش، اخیرا برای تشخیص هر چهار گونه انگل عامل مالاریای انسانی با تعداد زیاد نمونه مورد بررسی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

قرار گرفته است (۴۸) ولی هنوز به صورت یک روش روتین تشخیصی در آزمایشگاه‌های مناطق آندمیک مالاریا توسعه نیافته است.

تکنیک دیگر مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک، تکثیر هم دما به واسطه لوپ (Loop - mediated isothermal DNA amplification :LAMP) است که توسط نوتومی و همکاران در سال ۲۰۰۰ معرفی شد. در این روش تمام مراحل تکثیردر دمای ثابت ۶۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد یعنی به صورت تک دمایی انجام می‌گیرد و در نتیجه نیاز به ترموسایکلر ندارد. واکنش LAMP بدون نیاز به دناتوراسیون DNA الگو است و با کمک پلیمراز bst (Bacillus stearothermophilus) که قابلیت جانشینی در رشته را دارد انجام می‌گیرد. با توجه به اینکه این روش به دستگاه‌های گران قیمتی مانند ترموسایکلر نیاز ندارد، روشی با حساسیت بالا محسوب می‌شود که می‌تواند در آزمایشگاه‌های مناطق آندمیک مالاریا استفاده می‌شود. این روش از دقت و حساسیت بسیار بالایی برخوردار است که می‌تواند تشخیص را با تعداد اندک DNA شروع کند. حتی قادر است DNA را در کمتر از شش کپی در مخلوط واکنش شناسایی کند. این روش مقدار DNA تقویت‌شده را حتی تا یک میلیارد کپی (در مقایسه با یک میلیون کپی در واکنش PCR) در کم‌تر از یک ساعت افزایش می‌دهد. این روش جدید، روشی ساده اما با کارایی بسیار بالا است که کاملاً اختصاصی عمل کرده و با چهار الی شش پرایمر قادر است که هشت ناحیه ژنی از توالی هدف را طی واکنش LAMP شناسایی کند. برای آشکار شدن نتیجه نهایی می‌توان محصولات را حتی با چشم غیر مسلح بلافاصله بعد از پایان واکنش و یا حتی در حالی که واکنش در حال اجراست، مشاهده کرد و نیازی به الکتروفورز و استفاده از رنگ‌های سرطان زا برای رنگ‌آمیزی DNA نیست (۴۹). از دیگر روش‌های نوین تشخیص مالاریا می توان به Dielectrophoretic و magnetophoretic اشاره کرد که در حال توسعه هستند، اما حساسیت و اختصاصیت آنها هنوز به طور دقیق ارزیابی نشده است (۵۰).

از دیگر روش‌های درحال توسعه برای تشخیص مالاریا، روش مبتنی بر سیستم CRISPR است. این روش بر پایه تکثیر و سپس تشخیص DNA یا RNA انگل‌ها توسط guide RNA (gRNA) اختصاصی توالی هدف و سپس برش آن توسط آنزیم‌های cas13 و ایجاد رنگ توسط فلوروکروم‌های موجود در مخلوط واکنش است که با دستگاه‌های رنگ‌سنجی قابل تشخیص هستند (۵۱).

نتیجه‌گیری

در حال حاضر از روش مشاهده گسترش خونی با میکروسکوپ نوری و یا RDTs در تشخیص بیماری مالاریا استفاده می‌شود. درحالی‌که روش‌های مولکولی از جمله PCR به دلیل برخورداری از دقت و صحت بالا، مکملی خوب و مفید در موارد منفی کاذب در لام میکروسکوپی، شناسایی موارد بدون علامت و مطالعات اپیدمیولوژی است. در کنار این روش‌های تشخیصی معمول، همزمان با توسعه تکنولوژی‌های جدید، روش‌های نوینی در زمینه تشخیص مالاریا نظیر LAMP، Real- time PCR، Dielectrophoretic، magnetophoretic و روش مبتنی بر سیستم CRISPR پیشنهاد شده و در حال توسعه هستند که در بسیاری موارد با دقت بالایی قادر به تشخیص هستند، ولی در حال حاضر مناسب استفاده در مناطق آندمیک مالاریا نیستند. بنابراین دانشمندان در تلاش هستند تا بتوان از این روش‌های نوین نیز به عنوان روش‌های مکمل یا جایگزین برای تشخیص مالاریا در آینده استفاده کنند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاران گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین انستیتو پاستور ایران که ما را در گردآوری و نگارش این مقاله یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در انستیتو پاستور ایران بررسی و با کد اخلاق IR.PII.REC.1399.071 ثبت شده است.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

References

1. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17050.

2. Abbas N, Saba T, Rehman A, Mehmood Z, Javaid N, Tahir M, et al. Plasmodium species aware based quantification of malaria parasitemia in light microscopy thin blood smear. Microsc Res Tech. 2019;82(7):1198-214.

3. Raja TN, Hu TH, Kadir KA, Mohamad DSA, Rosli N, Wong LL, et al. Naturally Acquired Human Plasmodium cynomolgi and P. knowlesi Infections, Malaysian Borneo. Emerg Infect Dis. 2020;26(8):1801-9.

4. Tebben K, Bradwell K, Serre D. Variation in selective constraints along the Plasmodium life cycle. Infect Genet Evol. 2021;92:104908.

5. WHO. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2021.

6. Vatandoost H, Raeisi A, Saghafipour A, Nikpour F, Nejati J. Malaria situation in Iran: 2002-2017. Malar J. 2019;18(1):200.

7. Mehrizi AA, Torabi F, Zakeri S, Djadid ND. Limited genetic diversity in the global Plasmodium vivax Cell traversal protein of Ookinetes and Sporozoites (CelTOS) sequences; implications for PvCelTOS-based vaccine development. Infection, Genetics and Evolution. 2017;53:239-47.

8. Pirahmadi S, Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND. Analysis of genetic diversity and population structure of gene encoding cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) vaccine candidate antigen in global Plasmodium falciparum populations. Infection, Genetics and Evolution. 2018;59:113-25.

9. Talha AA, Pirahmadi S, Mehrizi AA, Djadid ND, Nour BY, Zakeri S. Molecular genetic analysis of Plasmodium vivax isolates from Eastern and Central Sudan using pvcsp and pvmsp-3α genes as molecular markers. Infection, Genetics and Evolution. 2015;32:12-22.

10. Zakeri S, Abouie Mehrizi A, Djadid ND, Snounou G. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical Plasmodium vivax isolates from Iran. Tropical Medicine & International Health. 2006;11(5):729-37.

11. Zakeri S, Avazalipoor M, Mehrizi AA, Djadid ND, Snounou G. Restricted T-cell epitope diversity in the circumsporozoite protein from Plasmodium falciparum populations prevalent in Iran. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2007;76(6):1046-51.

12. Zakeri S, Safi N, Afsharpad M, Butt W, Ghasemi F, Mehrizi AA, et al. Genetic structure of Plasmodium vivax isolates from two malaria endemic areas in Afghanistan. Acta Tropica. 2010;113(1):12-9.

13. Warhurst D, Williams J. ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. Journal of clinical pathology. 1996;49(7):533.

14. Wittekind DH. On the nature of Romanowsky--Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view. Histochem J. 1983;15(10):1029-47.

15. Bharti AR, Patra KP, Chuquiyauri R, Kosek M, Gilman RH, Llanos-Cuentas A, et al. Polymerase chain reaction detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum DNA from stored serum samples: implications for retrospective diagnosis of malaria. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(3):444-6.

16. WHO. Bench aids for the diagnosis of malaria infections. 2000.

17. CDC. Diagnostic Procedures: Centers for Disease Control and Prevention; [Available from: https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/index.html.

18. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: a brief review. Korean J Parasitol. 2009;47(2):93-102.

19. Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, Souza-Neto SM, Nogueira LL, Fukutani KF, et al. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. Malar J. 2010;9:117.

20. Morris U, Khamis M, Aydin-Schmidt B, Abass AK, Msellem MI, Nassor MH, et al. Field deployment of loop-mediated isothermal amplification for centralized mass-screening of asymptomatic malaria in Zanzibar: a pre-elimination setting. Malar J. 2015;14:205.

21. Bhandari PL, Raghuveer CV, Rajeev A, Bhandari PD. Comparative study of peripheral blood smear, quantitative buffy coat and modified centrifuged blood smear in malaria diagnosis. Indian J Pathol Microbiol. 2008;51(1):108-12.

22. Mekonnen SK, Aseffa A, Medhin G, Berhe N, Velavan TP. Re-evaluation of microscopy confirmed

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria by nested PCR detection in southern Ethiopia. Malar J. 2014;13:48.

23. Thepsamarn P, Prayoollawongsa N, Puksupa P, Puttoom P, Thaidumrong P, Wongchai S, et al. The ICT Malaria Pf: a simple, rapid dipstick test for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria at the Thai-Myanmar border. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1997;28(4):723-6.

24. Mouatcho JC, Goldring JPD. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. J Med Microbiol. 2013;62(Pt 10):1491-505.

25. Parra ME, Evans CB, Taylor DW. Identification of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 in the plasma of humans with malaria. J Clin Microbiol. 1991;29(8):1629-34.

26. WHO. Universal access to malaria diagnostic testing: an operational manual.: World Health Organization.

27. Gendrot M, Fawaz R, Dormoi J, Madamet M, Pradines B. Genetic diversity and deletion of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 and 3: a threat to diagnosis of P. falciparum malaria. Clin Microbiol Infect. 2019;25(5):580-5.

28. Wellems TE, Howard RJ. Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of Plasmodium falciparum. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(16):6065-9.

29. Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, et al. Pfhrp2 and pfhrp3 polymorphisms in Plasmodium falciparum isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. Malar J. 2013;12:34.

30. Barber BE, William T, Grigg MJ, Piera K, Yeo TW, Anstey NM. Evaluation of the sensitivity of a pLDH-based and an aldolase-based rapid diagnostic test for diagnosis of uncomplicated and severe malaria caused by PCR-confirmed Plasmodium knowlesi, Plasmodium falciparum, and Plasmodium vivax. J Clin Microbiol. 2013;51(4):1118-23.

31. Ngasala B, Mutemi DD, Mwaiswelo RO. Diagnostic Performance of Malaria Rapid Diagnostic Test and Microscopy Compared with PCR for Detection of Plasmodium falciparum Infections among Primary Schoolchildren in Kibiti District, Eastern Tanzania: An Area with Moderate Malaria Transmission. Am J Trop Med Hyg. 2019;101(4):809-11.

32. Tanizaki R, Kato Y, Iwagami M, Kutsuna S, Ujiie M, Takeshita N, et al. Performance of Rapid Diagnostic Tests for Plasmodium ovale Malaria in Japanese Travellers. Trop Med Health. 2014;42(4):149-53.

33. Das S, Jang IK, Barney B, Peck R, Rek JC, Arinaitwe E, et al. Performance of a High-Sensitivity Rapid Diagnostic Test for Plasmodium falciparum Malaria in Asymptomatic Individuals from Uganda and Myanmar and Naive Human Challenge Infections. Am J Trop Med Hyg. 2017;97(5):1540-50.

34. Das S, Peck RB, Barney R, Jang IK, Kahn M, Zhu M, et al. Performance of an ultra-sensitive Plasmodium falciparum HRP2-based rapid diagnostic test with recombinant HRP2, culture parasites, and archived whole blood samples. Malar J. 2018;17(1):118.

35. Mpina M, Stabler TC, Schindler T, Raso J, Deal A, Acuche Pupu L, et al. Diagnostic performance and comparison of ultrasensitive and conventional rapid diagnostic test, thick blood smear and quantitative PCR for detection of low-density Plasmodium falciparum infections during a controlled human malaria infection study in Equatorial Guinea. Malar J. 2022;21(1):99.

36. Zakeri S, Mamaghani S, Mehrizi A, Shahsavari Z, Raeisi A, Arshi S, et al. Molecular evidence of mixed P. vivax and P. falciparum infections in northern Islamic Republic of Iran. EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal, 10 (3), 336-342, 2004. 2004.

37. Turki H, Zoghi S, Mehrizi A, Zakeri S, Raeisi A, Khazan H, et al. Absence of asymptomatic malaria infection in endemic area of bashagard district, hormozgan province, iran. Iranian Journal of Parasitology. 2012;7(1):36.

38. Zoghi S, Mehrizi AA, Raeisi A, Haghdoost AA, Turki H, Safari R, et al. Survey for asymptomatic malaria cases in low transmission settings of Iran under elimination programme. Malaria Journal. 2012;11(1):1-10.

39. Nadeem MF, Khattak AA, Zeeshan N, Awan UA, Yaqoob A. Assessment of Microscopic Detection of Malaria with Nested Polymerase Chain Reaction in War-Torn Federally Administered Tribal Areas of Pakistan. Acta Parasitol. 2021;66(4):1186-92.

40. Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]

variant sequences in the small subunit rRNA gene. Parasitology International. 1997;46(2):91-5.

41. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. J Clin Microbiol. 2006;44(3):1087-9.

42. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Molecular and biochemical parasitology. 1993;58(2):283-92.

43. Pöschl B, Waneesorn J, Thekisoe O, Chutipongvivate S, Karanis P. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(1):56-60.

44. Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. Malar J. 2002;1:2.

45. Yentur Doni N, Yildiz Zeyrek F, Seyrek A. Detection of Plasmodium using filter paper and nested PCR for patients with malaria in Sanliurfa, in Turkey. Malar J. 2016;15(1):299.

46. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. Am J Trop Med Hyg. 1999;60(4):687-92.

47. Okyere B, Owusu-Ofori A, Ansong D, Buxton R, Benson S, Osei-Akoto A, et al. Point prevalence of asymptomatic Plasmodium infection and the comparison of microscopy, rapid diagnostic test and nested PCR for the diagnosis of asymptomatic malaria among children under 5 years in Ghana. PLoS One. 2020;15(7):e0232874.

48. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, and Plasmodium ovale for routine clinical diagnosis. J Clin Microbiol. 2004;42(3):1214-9.

49. Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? Cells. 2021;10(8).

50. Kasetsirikul S, Buranapong J, Srituravanich W, Kaewthamasorn M, Pimpin A. The development of malaria diagnostic techniques: a review of the approaches with focus on dielectrophoretic and magnetophoretic methods. Malar J. 2016;15(1):358.

51. Lee RA, Puig HD, Nguyen PQ, Angenent-Mari NM, Donghia NM, McGee JP, et al. Ultrasensitive CRISPR-based diagnostic for field-applicable detection of Plasmodium species in symptomatic and asymptomatic malaria. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020;117(41):25722-31.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-07-03]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1402.47.1.14.3]